

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657039

研究課題名(和文) オイルボディ形成の分子遺伝学的解明

研究課題名(英文) Molecular genetical study on oil body biogenesis

研究代表者

林 誠 (Hayashi, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：50212155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オイルボディは脂肪性種子の細胞に存在するオルガネラで、内部にトリアシルグリセロールを蓄積する。本研究の目的はオイルボディの形成に関わる遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることにある。そこで、オイルボディ膜タンパク質であるオレオシンとGFPからなる融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作製し、オイルボディのライブイメージング法を開発した。この方法を用いることでオイルボディに形態異常を示す7つの突然変異体の単離に成功した。そのうち2つについては原因遺伝子の特定および遺伝子産物の機能解析が終了した。残りの変異体については原因遺伝子の同定を行っている。

研究成果の概要(英文)：Oil body is a plant organelle that exists in cells of fatty seed. It accumulates triacylglycerol. Aim of this research is to identify genes involved in biogenesis of the oil body, and to reveal function of the gene product. I established transgenic Arabidopsis expressing a fusion protein composed of oleosin, an oil body membrane protein, and GFP. This transgenic plant was used to develop live-imaging technique to visualize oil body in cells of living plant. Using this technique, seven mutants with aberrant morphology of oil body have been isolated. Of these, two mutants were precisely analyzed. It allowed identification of two genes responsible for these mutants and characterization of the gene products. Map-base cloning of genes responsible for the rest of mutants is under investigation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：種子 オルガネラ オイルボディ オレオシン 植物油脂 バイオ燃料 バイオディーゼル バイオマス

#### 1. 研究開始当初の背景

オイルボディの内部には貯蔵脂肪としてトリアシルグリセロール (TAG) が蓄積しており、その外部はオレオシンと呼ばれる膜タンパク質を含む一重のリン脂質膜で取り込まれている。オイルボディは小胞体由来するオルガネラであると考えられている。オレオシンも小胞体で翻訳され、一旦小胞体膜に挿入された後にオイルボディ膜へ移行する。しかしながら、オレオシンや TAG がどのようにして小胞体の特定部位に集まってオイルボディを形成するか、またそれがどのように制御されているかは不明であった。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、分子遺伝学的なアプローチによってオイルボディ形成メカニズムを分子レベルで解明することにある。そのために、オイルボディの形成が異常になった突然変異体のスクリーニング法を開発し、得られた突然変異体の原因遺伝子の特定およびその遺伝子機能の同定を行った。

#### 3. 研究の方法

オレオシンと GFP (緑色蛍光タンパク質) からなる融合タンパク質を発現する遺伝子組換えシロイヌナズナ (OleG) を用いることで、生きた植物を用いたオイルボディのライブイメージング技術確立する。OleG 種子を変異源処理し、遺伝子変異を誘発し、M2 世代を得た。M2 世代のライブイメージングを行い、オイルボディの形態に異常を示す突然変異体の選抜法を開発する。得られた突然変異体については順次表現型解析、原因遺伝子特定、遺伝子産物の機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

蛍光顕微鏡観察法を検討し、OleG を生かしたままでオイルボディが観察できるライブイメージング法を確立した。この方法を応用することで、エチルメタンスルホン酸処理した OleG より、オイルボディの形態に異常を示す 7 つの変異体を単離し、うちの 2 つは原因遺伝子を特定することができた。1 つは *XRN4* であり、この遺伝子が外来 mRNA のサイレンシングを抑制することを明らかにした。*xrn4* 変異体では OleG mRNA が転写後サイレンシングを受けることで、内在オレオシン mRNA のコサプレッションも誘発され、GFP 蛍光が減少し、オイルボディが大きくなっていった。現在、*XRN4* のさらなる機能解明をめざして、*xrn4* サプレッサー変異体を解析中である。もう一つの原因遺伝子については、トリアシルグリセロールの分解に関わることが判明しており、現在論文準備中である。残りの 5 つの変異体については順に原因遺伝子の同定を行っており、今後これらの解析結果を統合することでオイルボディの形成機構を明らかにしたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Hayashi, M., Nanba, C., Saito M., Kondo, M., Takeda, A., Watanabe Y. and Nishimura, M. (2012) Loss of XRN4 function can trigger cosuppression in a sequence-dependent manner. *Plant Cell Physiol.*, 53, 1310-1321.

Toyokura, K., Hayashi, M., Nishimura, M. and Okada, K. (2012) Adaxial-abaxial patterning: A novel function of the GABA shunt. *Plant Signal. Behav.* 7, 705-707.

Cui, S., Fukao, Y., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2013) Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEROXIN 7. *J. Biol. Chem.* 288, 6014-6023.

Kanai, M., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (2013) The Plastidic DEAD-box RNA helicase 22, HS3, is essential for plastid functions both in seed development and in seedling growth. *Plant Cell Physiol.* 54, 1431-1440.

Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y. and Nishimura, M. (2013) Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4956-4966.

Cui, S., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2013). Novel proteins interacting with peroxisomal protein receptor PEX7 in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* 8, e26829.

Satoh, M., Tokaji, Y., Nagano, A., Hara-Nishimura, I., Hayashi, M., Nishimura, M., Ohta, H., Masuda, S. (2014) Arabidopsis mutants affecting oxylipin signaling in photo-oxidative stress responses. *Plant Physiol Biochem.* 81, 90-95.

Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Goto-Yamada, S., Mano, S., Yamada, K., Kondo, M., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y. and Nishimura, M. (2014) Plant autophagy is responsible for peroxisomal transition and plays an

important role in the maintenance of peroxisomal quality. *Autophagy* 10, 1-2.

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(17 件)

柴田美智太郎, 及川和聡, 吉本光希, 近藤真紀, 真野昌二, 山田健志, 林 誠, 坂本亘, 大隅良典, 西村幹夫: 酸化になったペルオキシソームはオートファジーのシステムで分解される。日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-20日

及川和聡, 真野昌二, 林 誠, 山田 健志, 近藤 真紀, 東 正一, 渡辺 正勝, 三ツ井 敏明, 飯野 敬矩, 重政 彰徳, 細川 陽一郎, 西村 幹夫: フェムト秒レーザーを用いた光依存的オルガネラ間接着力評価。日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-20日

Nguyen, H. A., Matsui, A., Hayashi, M., Nguyen, V. D. and Seki, M.: Loss of 5' -3' exoribonuclease CRN4 function enhances heat tolerance in Arabidopsis. 日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-20日

Otomo, M., Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M. and Hayashi, Y.: Localization analysis of proteins that are involved in material transport to glyoxysomes in Arabidopsis. 日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-20日

Cui, S., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Study of organelle interaction between oil bodies and peroxisomes. 日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-20日

金井雅武, 林 誠, 西村幹夫: 種子特異的な乾燥耐性を担う遺伝子 DPS1 の同定とその機能解析。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21-23日

中井篤, 林 誠, 深尾陽一郎, 吉瀬(新井) 祐子, 西村幹夫: ペルオキシソーム局在型 benzoyltransferase はベンゼノイド産生を触媒する。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21-23日

Cui, S., Fukao, Y., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Identification and functional characterization of novel factors regulating peroxisomal protein receptor PEX7. 第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21-23日

及川和聡, 柴田美智太郎, 近藤真紀, 真野昌

二, 林 誠, 吉本光希, 大隅良典, 西村幹夫: ペルオキシソーム局在異常変異体 peup4 の解析。第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月21-23日

及川和聡, 柴田美智太郎, 近藤真紀, 吉本光希, 近藤真紀, 林 誠, 大隅良典, 西村幹夫: 植物ペルオキシソーム分解異常変異体の解析。日本生化学会中部支部会、名古屋大学、2013年5月25日

遠藤聡至, 藤川愉吉, 大島良美, 真野昌二, 林 誠, 西村幹夫, 江坂宗春: シロイヌナズナにおけるカタラーゼのペルオキシソーム輸送機構の解明。日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会、広島大学、2013年9月5-6日

柴田美智太郎, 及川和聡, 吉本光希, 近藤真紀, 真野昌二, 山田健志, 林 誠, 坂本亘, 大隅良典, 西村幹夫: シロイヌナズナにおけるオートファジーは劣化したペルオキシソームを選択的に分解する。日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3-6日

田中美名, 義則有美, 中山朋美, 林 誠, 西村幹夫: 胚軸プラスチックにおけるデンプン蓄積の制御。第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月16-18日

中井篤, 林 誠, 深尾陽一郎, 吉瀬(新井) 祐子, 西村幹夫: 定量プロテオミクスを用いたダイズ子葉のペルオキシソーム機能転換の解析。第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月16-18日

Cui, S., Fukao, Y., Hayashi, M., and Nishimura, M.: Identification of novel peroxisomal biogenesis factors binding to PEX7. 第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月16-18日

林 誠, 難波千苺子, 斉藤美幸, 近藤真紀, 竹田篤史, 渡邊雄一郎, 西村幹夫: XRN4 変異は形質導入遺伝子依存的に内在遺伝子のサイレンシングを誘発する。第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月16-18日

金井雅武, 林 誠, 近藤真紀, 西村幹夫: HS3 は発芽後の初期生長と貯蔵脂質合成に関与する。第53回日本植物生理学会年会、京都、2012年3月16-18日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page\\_id=72](http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page_id=72)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 誠 （長浜バイオ大）

研究者番号：50212155

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：